云 南 植 物 研 究 1990; 12 (1): 80—84
Acta Botanica Yunnanica

白百利烟草愈伤组织细胞细胞分裂素结合蛋白的研究

张克荣 姚意弘 吕美薇 高国肖 倪德祥 孙鸿乔
（复旦大学生命科学学院，上海）

摘要 利用BA-Sepharose 4 B亲和层析技术从白百利烟草（*Nicotiana tabacum* Baibaili）愈伤组织细胞分离提纯了分子量为4400±100道尔顿的细胞分裂素结合蛋白(CB-蛋白)。在细胞表面、核糖体、线粒体、叶绿体和细胞核上以及在细胞液中都有CB-蛋白存在，而核糖体上的CB-蛋白含量最高。探讨了CB-蛋白的功能。

关键词 烟草；亲和层析；细胞分裂素结合蛋白；细胞器

内源的植物激素在植物的生长发育中起着调控的作用[1]，在烟草叶子中促进RNA和蛋白质的合成[2—4]。为了进一步认识细胞分裂素在细胞的生长发育中的作用机理，日本等国家的科学家开展了细胞分裂素结合蛋白(Cytokinin Binding Protein缩写为CB-蛋白）的研究工作。本文报道我们采用SDS 方法和 Morrison [5]方法，应用亲和层析技术从白百利烟草愈伤组织细胞中提纯了细胞分裂素结合蛋白，分析了细胞分裂素结合蛋白在各细胞器中的含量，探讨了细胞分裂素结合蛋白的作用机理。

材 料 和 方 法

1.白百利烟草细胞的培养

采用前文[6]所述的方法培养白百利烟草（*Nicotiana tabacum* Baibaili）愈伤组织。愈伤组织切成0.3—0.5 cm^3的小块，放在盛有100 ml LNB_5液体培养基[7]的三角烧瓶中，在来复式摇床上振荡培养7—8天，得到白百利烟草细胞。在继代培养中5天传代一次，接种量与培养体积为1：5。

2.白百利烟草细胞细胞器的分离提取

白百利烟草愈伤组织置于含有50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.8)，10 mmol/l $(CH_3COO)_2Mg$，4 mmol/l 2-巯基乙醇和0.4 mol/l蔗糖的缓冲液中，捣成匀浆，纱布过滤；滤液在500×g下离心3分钟，沉淀物Ⅰ含有细胞核；上清液在1000×g下离心10分钟，沉淀物Ⅱ含有叶绿体；第二次离心所得的上清液在10000×g下离心30分钟，沉淀物Ⅲ含有线粒体；第三次离心所得的上清液在105000×g下离心90分钟，沉淀物Ⅳ含有核糖体；最后的上清液为细胞液。

1988-11-24收稿

把沉淀物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ各分成两份，其中1份用50 mmol/l Tris-HCl (pH7.5)悬浮，另1份用含有5％正丁醇、15 mmol/l NaCl、0.1mmol/l EDTA的10mmol/l Tris-HCl (pH7.5) (B-TBSE) 缓冲液悬浮，来分别抽提CB-蛋白；然后分别把抽提液在100000×g下离心15分钟；把离心所得的沉淀Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和上清液Ⅰ′、Ⅱ′、Ⅲ′、Ⅳ′，连同细胞液、分别上结合有6-苄基腺嘌呤 (BA) 的Sepharose 4B亲和层析柱，提纯CB-蛋白。上述离心均在4℃下进行。

3.白百利烟草细胞表面蛋白（TCSP）和表面盐溶性蛋白（TSP）的提取

采用Morrison方法和SDS方法[5]抽提TCSP蛋白和TSP蛋白。Morrison方法是先用LNB_5培养基洗白百利烟草细胞3次，洗涤过的烟草细胞与等体积的B-TBSE相混合，在室温下浸提TCSP蛋白，在80-1型沉淀器以3000 r·p·m离心15分钟，上清液为含有TCSP蛋白溶液。用等体积的含15 mmol/l NaCl的10 mmol/l Tris-HCl (pH7.5)(TBS)进一步处理洗涤过的烟草细胞，浸提TSP蛋白，以3000 r·p·m离心15分钟，上清液为含有TSP蛋白溶液。含有TCSP蛋白和TSP蛋白溶液上BA-Sepharose-4B亲和层析柱，提纯CB蛋白。

在SDS法提取TCSP蛋白和TSP蛋白，除了用等体积的含4％SDS（十二烷基硫酸钠）、15 mmol/l NaCl的15 mmol/l磷酸缓冲液 (pH7.5) 与烟草细胞相混合，在室温下浸提30分钟抽提TCSP蛋白外，其它方法同Morrison方法。

4. CB-蛋白的提纯

（1）BA-Sepharose 4B亲和层析柱的制备

先用10^{-4} N HCl反复洗溴化氰活化的Sepharose 4B，继之用双蒸水淋洗活化的Sepharose 4B。洗过的活化的Sepharose 4B置于1.5×10^{-4} mol/l BA溶液中，于4℃下搅拌过夜。已接BA的Sepharose 4B装柱 (1.4×6 cm) 后，先用50mmol/l的乙醇胺洗去未接上的BA，继之用双蒸水洗至pH6.0。

（2）CB蛋白的亲和层析

将含有CB-蛋白的TCSP、TSP蛋白溶液和从各细胞器抽提的含有CB-蛋白的Ⅰ′、Ⅱ′、Ⅲ′、Ⅳ′、和细胞液分别上BA-Sepharose 4B柱；先用50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5) 溶液洗脱，弃去洗脱液，继之用50 mmol/l pH8.5的Tris-HCl洗脱，弃去洗脱液，再用0.5 mol/l KCl溶液洗脱，弃去洗脱液，最后用50 mmol/l KOH溶液洗脱，收集洗脱液。最后一部分洗脱液为含有CB-蛋白溶液，经过浓缩后用于定量和分子量测定。

5. CB-蛋白分子量的测定

采用Sephadex G-25柱(2×50 cm)测定CB-蛋白分子量。用胰岛素 (M·W5 700)、溶菌酶(M·W12 900)、天花粉蛋白M·W25 600)和牛血清白蛋白(M·W68 000) 作为标准蛋白，0.2 mol/l NaCl为洗脱剂，制作蛋白质分子量-洗脱体积的标准曲线。浓缩的CB-蛋白上与标准蛋白相同条件的Sephadex G-25柱，用0.2 mol/l NaCl洗脱，按洗脱体积从标准曲线上查得分子量。

6.蛋白质含量的测定

采用Bradford[8]的方法测定蛋白质的含量。

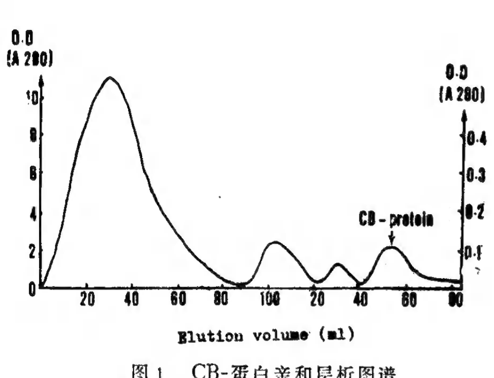
结 果 和 讨 论

1. CB-蛋白的亲和层析

从白百利烟草细胞的表面蛋白、表面盐溶蛋白和细胞器中提取的CB-蛋白，经过BA-Sepharose 4B柱的亲和层析，都得到如图1所示的亲和层析图谱，提取得CB-蛋白。

2. CB-蛋白的分子量测定

标准蛋白上Sephadex G-25柱，用0.2 mol/l NaCl、流速为0.5 ml/分钟洗脱，得到如图2所示的标准曲线。CB-蛋白的洗脱体积为82ml，从标准曲线上查得白百利烟草细胞CB蛋白的分子量为4 400±100道尔顿。



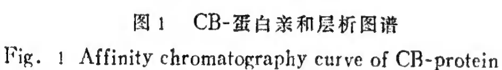

图1　CB-蛋白亲和层析图谱

Fig. 1 Affinity chromatography curve of CB-protein

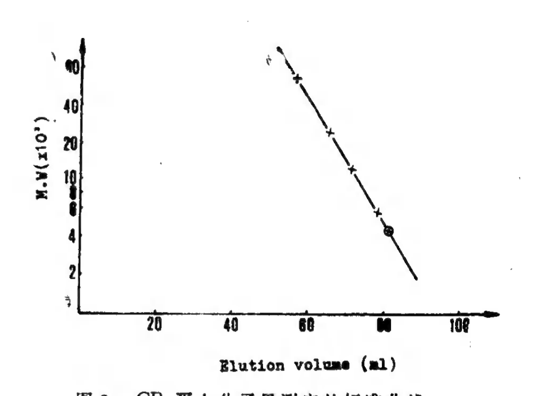


图2　CB-蛋白分子量测定的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of M. W measurement for CB-protein

3. CB-蛋白在白百利烟草细胞中的分布

用Morrison方法和SDS方法抽提白百利烟草细胞的TCSP蛋白和TSP蛋白，然后又分别把TCSP蛋白溶液和TSP蛋白溶液上BA-Sepharose 4B亲和层析柱，提取CB-蛋白，比较分析了细胞的总蛋白、TCSP蛋白、TSP蛋白和CB-蛋白的关系，得到表1所示的结果。

白百利烟草愈伤组织经过匀浆，分级分离，分别得到细胞核、叶绿体、线粒体、核糖体和细胞液，用50mmol/l Tris-HCl (pH7.5) 和B-TBSE分别洗下这几种细胞器上的可溶性蛋白，然后把洗下的蛋白上BA-Sepharose 4B柱，提纯CB-蛋白，并进行定量分析，得到表2所示的结果。

根据表1的数据，在细胞表面的CB-蛋白占全细胞CB-蛋白的10%左右，而且占TCSP的2.97%，仅次于核糖体上的CB-蛋白含量，这一结果很值得注意。现在一般认为，脊椎动物、无脊椎动物和细菌的识别反应发生在细胞表面，质膜的外部蛋白是识别的场所[9]。在植物细胞，细胞壁的存在使问题复杂化了。Noggle[10]曾著文推测初生壁的许多组分可能是质膜的外延，在分生组织细胞或缺次生壁的细胞表面同样可以发生识别反应。研究工作表明植物细胞的TCSP及其TSP是质膜蛋白组分的外延[11-13]。因为

我们从TCSP蛋白中提取到了CB-蛋白，其绝对含量仅次于核糖体，所以认为CB-蛋白也分布在细胞的表面。TCSP 中的 CB-蛋白的作用机理可能与生长素受体蛋白的作用相类似，可能起着识别的作用。

表1　CB-蛋白与TCSP和TSP蛋白的关系

Table 1 Relation among TCSP, TSP and CB-protein

composition of protein	method of SDS (mg protein. g cell)	method of Morrison (mg protein. g cell)
total protein in cell	24.632	24.374
TCSP	1.975	1.717
TSP	1.148	0.961
CB-protein in cell	0.511	0.504
CB-protein in TCSP	0.053	0.051
CB-protein in TSP	0.049	0.045
percent of TCSP in total protein in cell	8.02%	7.04%
percent of CB-protein in TCSP	2.68%	2.97%
percent of TSP in TCSP	58.12%	55.39%
percent of CB-protein in TCSP in CB-protein in cell	9.59%	10.12%

表2　CB-蛋白在白百利烟草细胞内的分布

Table 2 Distribution of CB-protein in Baibaili tobacco cell

composition of cell	soluble protein mg protein. g FW callus	CB-protein mg protein. g FW callus	CB-protein soluble protein x(%)
nucleus in Tris-HCl	0.363	0.0101	2.8
nucleus in B-TBSE	0.708	0.0106	1.5
chloroplast in B-Tris-HCl	0.171	0.0043	2.5
chloroplast in B-TBSE	0.434	0.0048	1.1
mitochondria in Tris-HCl	0.705	0.0169	2.4
mitochondria in B-TBSE	1.548	0.0310	2.0
ribosome in Tris-HCl	1.232	0.0468	3.8
ribosome in B-TBSE	2.349	0.0634	2.7
cell sap	19.688	0.394	2.0

从表 2 可见，CB-蛋白除位于细胞表面外，还存在于核糖体、细胞核、线粒体，在胞液中也含有CB-蛋白。CB-蛋白存在于这些部位的具体功能还不清楚，存在于细胞表面的CB-蛋白与存在于细胞器上的CB-蛋白之间的关系也不清楚。通过对生长素在细胞内的结合位点和生长素受体蛋白的互补研究，提出有 3 种类型的生长素结合位点，它们分别被称为位点Ⅰ（与内质网相联系）、位点Ⅱ（与液胞膜相联系）、位点Ⅲ（在质膜中发现）。其中位点Ⅰ为前受体[15]，位点Ⅲ是生长素的运输位点[16]。现在普遍认为生长素在这些位点与受体结合，其结合的效应与生长素诱导植物的生长发育有一定的关系。因此，我们设想，在植物细胞内，接受细胞分裂素的位点可能不止一个，每个结合位点其功能有异，在不同部位结合细胞分裂素的CB-蛋白，尽管它们的分子量基本上是在4400±100道尔顿，但是，它们在特性和功能上可能不同。有的可能起着识别的作用，如位于细胞表面的CB-蛋白。有的可能参于细胞分裂素的运输。有的CB-蛋白为细胞分裂素参于DNA转录、转译和合成蛋白质服务。也就是说，在 BA 存在的情况下，CB-蛋白促进RNA聚合酶的活性，进而加快了 DNA 的转录，在细胞分裂素和基因物质之间起

一个"中间体"的作用，从而参于 DNA 的转录、转译。核糖体是合成蛋白质的场所，CB-蛋白在核糖体上含量最高，说明了CB-蛋白参于了蛋白质的合成，至少是影响蛋白质合成的一个重要因子。然而，这些分析有的仅是设想、有的实验证据还不十分充分，还有待于进一步研究证实。

参 考 文 献

1 张克荣，倪德祥. 自然杂志 1988; 11:845—850
2 Sugiwra M et al. *Physiol Plantarum* 1962; 15:475—463
3 Osborne D J. *Plant Physiol* 1962; 37:595—602
4 Roychoudhurry R et al. *Bicchem Biophys* 1965; 107:346—357
5 Morrison et al. *J Bio Chem* 1975; 250:2911—2919
6 张克荣等. 自然杂志 1988; 11:75—76
7 Child J J, Larue T A. Plant Tissue Culture Methods. N. R. C. Press 1975:87—90
8 Marion M Bradford. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248—254
9 Mosona A A, The Cell Surface In Development. New York Press 1974
10 Noggle G R. *Physiology* 1979; 10:5—8
11 刘承宪等. 植物生理学报 1980; 6:263—275
12 刘承宪等. 植物生理学报 1981; 7:301—310
13 刘承宪等. 植物生理学报 1982; 8:1—7
14 Dohrmann V. *Plant Science Letter* 1977; 9:291—299
15 Venis. *Adv Bot Res* 1977a; 5:53—88
16 Jocobs M et al. *Planta* 1978; 142:1—10

STUDY ON CYTOKININ BINDING PROTEIN FROM CELL OF BAIBAILI TOBACCO CALLUS

Zhang Kerong, Yao Yihong, Lu Meiwei,
Gao Guoxiao, Ni Dexiang, Sun Hongqiao

(*School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai*)

Abstract Cytokinin binding proteins (CB-protein) which moleculer weight are about 4400±100 dalton from cell of Baibaili tobacco callus was purified by affinity chromatography on benzylaminopurin-linked sephrose 4B column. There is CB-protein on cell surface, ribosome, mitochondria, chloroplast and nucleus as well as in cell sap; amount of CB-protein on ribosome is the highest among organelles. We probed into the function of CB-protein.

Key words *Nicotiana tabacum*; Affinity chromatography; Cytokinin binding protein; Organelle